

17.11.2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 13 JAN 2005

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年 1 1 月 2 5 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 3 9 4 6 9 5  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 3 - 3 9 4 6 9 5 ]

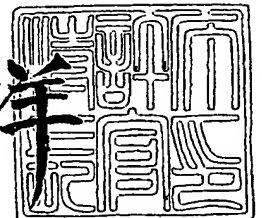
出 願 人            株式会社カネカ  
Applicant(s):

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 2 月 2 4 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願  
【整理番号】 B030458  
【提出日】 平成15年11月25日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A23L 1/052  
A61K 35/78

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都北区豊島 1-5-10-602  
【氏名】 薩 秀夫

【発明者】  
【住所又は居所】 兵庫県加古川市平岡町二俣 861-9  
【氏名】 前 辰正

【発明者】  
【住所又は居所】 兵庫県明石市二見町東二見 515-1 メゾンドール明石東二見  
605号  
【氏名】 塚川 美寿

【発明者】  
【住所又は居所】 兵庫県神戸市須磨区離宮西町 1-2-20-804  
【氏名】 北原 幹郎

【発明者】  
【住所又は居所】 兵庫県加古川市西神吉町岸 684-9  
【氏名】 横田 真一

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都豊島区目白 3-7-2  
【氏名】 清水 誠

【特許出願人】  
【識別番号】 000000941  
【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社  
【代表者】 武田 正利

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 005027  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項 1】

ペパーミント抽出物及び／又はドクダミ抽出物を有効成分として含有することを特徴とするインターロイキン-8 産生促進剤。

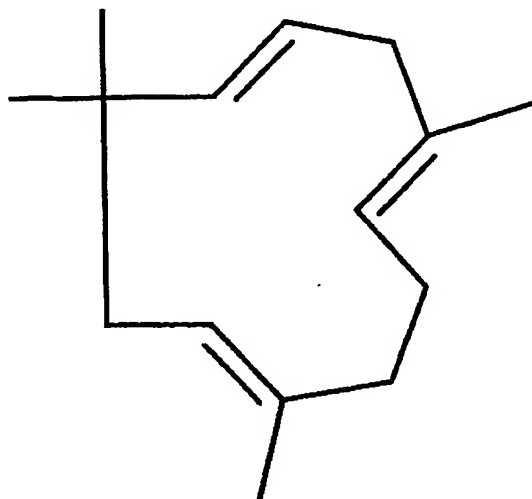
## 【請求項 2】

カンゾウ抽出物を有効成分として含有することを特徴とするインターロイキン-8 産生促進剤。

## 【請求項 3】

一般式 (1) で表される  $\alpha$ -フムレン；

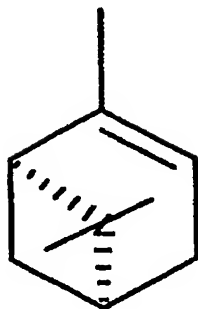
## 【化 1】



(1)

一般式 (2) で表される  $\alpha$ -ピネン：

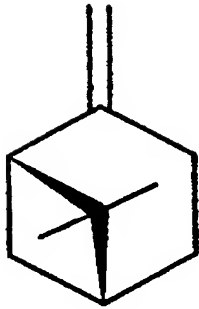
## 【化 2】



(2)

一般式 (3) で表される  $\beta$ -ピネン：

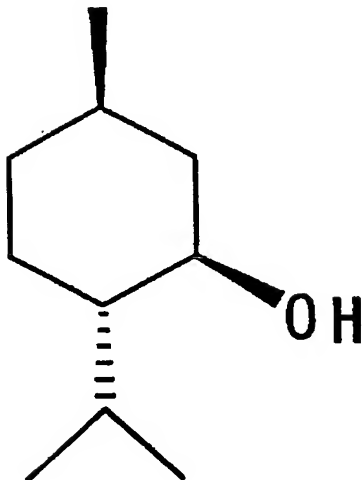
【化3】



(3)

、及び、一般式(4)で表されるL-メントール:

【化4】



(4)

からなる群より選ばれた少なくとも1種の化合物を有効成分として含有することを特徴とするインターロイキン-8産生促進剤。

【請求項4】

請求項1～3記載のいずれかに記載のインターロイキン-8産生促進剤を含有することを特徴とする免疫賦活剤。

【請求項5】

請求項1～3記載のいずれかに記載のインターロイキン-8産生促進剤を含有することを特徴とする感染症予防及び／又は改善剤。

【請求項6】

請求項4記載の免疫賦活剤または請求項5記載の感染症予防及び／または改善剤を配合することを特徴とする飲食品。

【請求項7】

請求項1～3記載のいずれかに記載のインターロイキン-8産生促進剤を含有することを特徴とする飲食品。

【書類名】明細書

【発明の名称】IL-8 産生促進剤とその用途

【技術分野】

【0001】

本発明は、インターロイキン-8 産生促進剤、及び、これを含有することを特徴とする免疫賦活剤、または感染症の予防及び／又は改善剤に関する。

【背景技術】

【0002】

腸管は口から入った多種類の食品等と直接接触するため、有害物質を排除する機能と有用な成分を吸収するという生命の維持にかかせない2つの機能を併せ持つ。食品の生理機能は、主に腸管での物質吸収および吸収した成分が細胞を介しておこすシグナル伝達やサイトカイン制御などによって発揮されるが、それら腸管機能の中でも、腸管免疫は体の免疫機構の最前線として重要な役割を持つ。腸管には経口摂取された抗原に対して免疫反応を惹起する免疫担当組織（GALT: gut associated lymphoreticular tissue）と、食品から栄養素などの有用成分を吸収する腸管上皮細胞がある。食品成分はそれら細胞に直接あるいは間接的に働きかけることで免疫調節、すなわち免疫促進や免疫抑制を行っている。

【0003】

腸管上皮細胞はTGF- $\beta$ やIL-1 $\beta$ 、IL-10、TNF- $\alpha$ などのサイトカイン類や、IL-8などのケモカイン類を産生しており、種々の病原性細菌感染によりケモカイン類が増加することが知られている。腸管上皮細胞と免疫担当細胞はサイトカインやケモカインで相互作用しており、中でもIL-8は生体防御や免疫機構、炎症反応に深く関係する。好中球遊走・活性化因子であるインターロイキン-8（以下、IL-8と略す）は、1987年にLPS刺激したヒト末梢血単核球より精製・クローニングされた（非特許文献1）。

【0004】

IL-8は、単球、マクロファージ、繊維芽細胞、血管内皮細胞、肥満細胞、表皮細胞などによって産生され、好中球、CD8+T細胞、ナチュラルキラー細胞、単球などを標的細胞としている。IL-8の機能としては、好中球走化性、好塩基球・T細胞の遊走活性、骨髄より末梢血への好中球の動員、好中球における細胞内リソゾーム酵素の放出・ロイコトリエンB<sub>4</sub>（LTB<sub>4</sub>）の産生誘導・活性酸素の産生誘導など好中球の活性化、好中球の血管内皮細胞への接着増強、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HVEC）に対する好中球の遊走活性、血管新生への関与などが知られている（非特許文献2）。

【0005】

また、好中球は外から侵入してくる大腸菌、ブドウ球菌、連鎖球菌、肺炎球菌などの細菌類やウイルス、真菌類を貪食する能力を保有する生体防御の中心となる白血球細胞であり、IL-8はその活性化を促進し、好中球の能力を高めることが知られている。食品を摂取することにより積極的に免疫を増強する作用は、体の抵抗力をつけて感染症の予防あるいは改善につながり、また免疫増強に関与するサイトカイン類等により、アレルギーなどの免疫疾患の改善効果や抗腫瘍効果も期待される。これまでに、腸管での食品成分吸収や透過に関する報告はあるが、食品成分が腸管上皮細胞に与える影響を直接証明した例は、クルクミンのIL-8産生抑制（非特許文献3）、乳酸菌などの微生物菌体を経口摂取することによるIL-8産生促進（特許文献1）などがあるが報告例は少ない。

【0006】

また、バクテリアの腸管上皮細胞への侵入により、IL-8産生が増加することが報告されており（非特許文献4）、IL-8は生体防御や免疫、炎症反応に関連が深いことから、腸管上皮細胞でのIL-8産生促進は積極的に免疫賦活および感染症予防や改善に特に有用であると考えられる。

【0007】

ペパーミント又はその抽出物、ドクダミ又はその抽出物、カンゾウ又はその抽出物がIL-8産生を促進すること、又はIL-8に起因する免疫賦活、あるいは感染症予防及び

／又は改善に有用であることは知られていない。

【0008】

また、 $\alpha$ -フムレン、ピネン、 $\gamma$ -メントールがIL-8産生を促進すること、又はIL-8に起因する免疫賦活、あるいは感染症予防及び／又は改善に有用であることは知られていない。

【特許文献1】特開2003-63991

【非特許文献1】Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9233~9237, 1987

【非特許文献2】細胞工学別冊・ケモカインハンドブック、第1版、32~34頁、秀潤社、2000年

【非特許文献3】J. Immunol., 163, 3474, 1999

【非特許文献4】J. Clin. Invest., 95, 55~65, 1995

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

安全な食品素材由来であるIL-8産生促進剤であれば、保健機能食品（特定保健用食品、栄養機能食品）、健康食品、栄養補助食品などの飲食品、あるいは医薬品又は医薬部外品などとして、免疫応答の賦活作用、感染症の予防及び／又は改善に有用である。しかし、好中球を活性化し食能を高める目的によりIL-8などのケモカイン類を摂取し続けることは難しい。よって、本発明は、安全な食品素材由来であるIL-8産生促進剤、及び、これを含有することを特徴とする免疫賦活剤、または感染症の予防及び／又は改善剤を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、ペパーミント、ドクダミ、カンゾウからなる少なくとも1種の植物抽出物を有効成分として含有することを特徴とする組成物がIL-8産生を促進すること、および $\alpha$ -フムレン、 $\alpha$ -ピネン、 $\beta$ -ピネン、 $\gamma$ -メントールからなる群より選ばれた少なくとも1種の化合物を有効成分として含有することを特徴とする組成物がIL-8産生を促進することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】

すなわち、本発明は、ペパーミント抽出物及び／又はドクダミ抽出物を有効成分として含有することを特徴とするIL-8産生促進剤に関する。

【0012】

また、本発明は、カンゾウ抽出物を有効成分として含有することを特徴とするIL-8産生促進剤に関する。

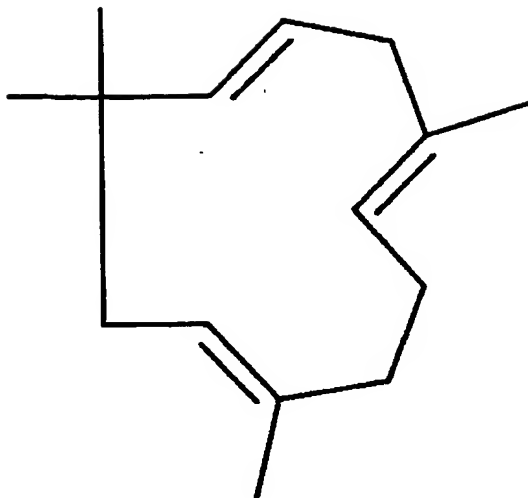
【0013】

また、

一般式(1)で表される $\alpha$ -フムレン；

【0014】

【化5】

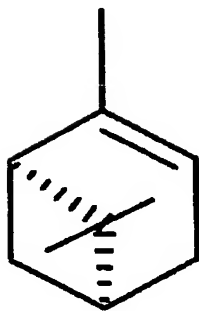


(1)

一般式 (2) で表される  $\alpha$ -ピネン:

【0015】

【化6】

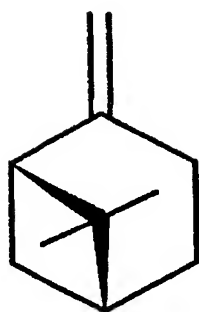


(2)

一般式 (3) で表される  $\beta$ -ピネン:

【0016】

【化7】

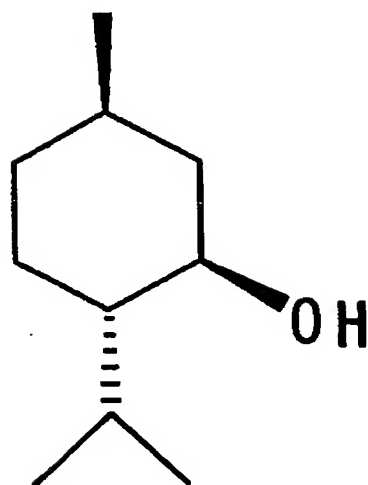


(3)

、及び、一般式(4)で表されるL-メントール:

【0017】

【化8】



(4)

からなる群より選ばれた少なくとも1種の化合物を有効成分として含有することを特徴とするインターロイキン-8産生促進剤に関する。

【発明の効果】

【0018】

本発明によれば、安全な食品素材由来であるIL-8産生促進剤、及び、これを含有することを特徴とする免疫賦活剤、または感染症の予防及び／又は改善剤を得ることができる。これらは、免疫応答の賦活、感染症の予防及び／又は改善に有用であり、保健機能食品(特定保健用食品、栄養機能食品)、健康食品、栄養補助食品などの飲食品、あるいは医薬品又は医薬部外品などとして利用できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

以下に、本発明の実施の形態を詳しく説明する。

【0020】



本発明のIL-8産生促進剤は、ペパーミント、ドクダミ、カンゾウからなる少なくとも1種の植物抽出物を有効成分とするものであり、抽出物そのものでもよいし、それに公知の担体や助剤、飲食物材料、薬剤学的に許容される他の製剤素材などを添加した組成物でもよい。本発明のペパーミント、ドクダミ、カンゾウからなる少なくとも1種の植物抽出物は、ヒト及び／又は動物のIL-8産生を促進する。また、本発明のIL-8産生促進剤は、IL-8産生を促進することから、IL-8に起因する免疫賦活剤、または感染症の予防及び／又は改善剤として使用できる。

#### 【0021】

本発明に使用するペパーミントは、シソ科ハッカ属 (*Mentha piperita* L.; セイヨウハッカや *Mentha arvensis*; ハッカ) の全草であり、また、本発明に使用するドクダミは、ドクダミ科ドクダミ属の *Houttuynia cordata* Thunb. の地上部 (葉、茎、花など) であり、ジュウヤクともいう。カンゾウはマメ科カンゾウ属の *Glycyrrhiza uralensis* Fish. の根茎部であり、これらはいずれも食品又は食品素材であって、十分な食経験があり、副作用や安全性に問題がない。

#### 【0022】

本発明に使用するペパーミント、ドクダミ、カンゾウの各抽出物は、上記植物から溶媒抽出などによって得ることができる。また、当該抽出物を得る方法は、溶媒抽出に限定されず、水蒸気蒸留や、超臨界抽出技術を用いた二酸化炭素による抽出などの抽出操作を用いてもよい。さらに、当該抽出物は、飲食品や医薬品として不適当な不純物を含有しない限り、抽出液のまま、又は粗抽出物あるいは半精製抽出物として本発明に使用できる。

#### 【0023】

製造方法は、常温・常圧下で抽出溶媒を用いて行えばよく、抽出後は濃縮乾固或いは油脂等により溶液状、ペースト状、ゲル状、粉状としてもよい。抽出温度は特に限定されず、一般に-20℃~100℃、好ましくは1~80℃、より好ましくは20~60℃の条件下で、また抽出時間も特に限定されず、一般に0.1~1ヶ月、好ましくは0.5時間から7日間、攪拌または放置する。また、二酸化炭素等による超臨界条件での抽出も可能である。必要であれば、さらに活性炭処理やイオン交換樹脂等により、任意の操作で精製することもできる。

#### 【0024】

溶媒抽出を行う場合には、例えば、上記各植物の原形、粉碎したもの又は粉末を、1~20倍量の下記溶媒に浸し、攪拌又は放置し、濾過又は遠心分離などにより抽出液を得ることができる。次いで、得られた抽出液を濃縮して、溶媒を除去することにより、当該抽出物を得ることができる。

#### 【0025】

抽出に用いる溶媒は、食品、食品添加物、医薬品などの製造、加工に使用できる安全なものが好ましく、例えば、水、エタノール、アセトン、グリセリン、酢酸エチル、プロピレングリコール、ヘキサン、食用油脂などが挙げられ、また、これら溶媒のうち少なくとも2種以上を混合して用いてもよい。抽出後の溶媒除去が容易な点から、エタノール、アセトン、酢酸エチル、ヘキサンなどの有機溶媒が好ましく、残留溶媒の安全性の点からはエタノールがより好ましい。

#### 【0026】

このようにして得られる抽出物の中でも、ペパーミントの全草から水蒸気蒸留又は溶媒抽出して得られるペパーミント抽出物は、香辛料抽出物の一種であって、苦味料などの用途の既存添加物である。また、ドクダミの葉からエタノールで抽出し精製して得られるドクダミ抽出物は、酸化防止剤用途の既存添加物である。また、カンゾウの根からエタノールで抽出して得られるカンゾウ抽出物は酸化防止剤用途の既存添加物である。本発明においては、これらの食品添加物として認められているペパーミント抽出物、ドクダミ抽出物、カンゾウ抽出物を使用することもできる。

#### 【0027】

本発明によるペパーミント抽出物、ドクダミ抽出物及び／又はカンゾウ抽出物を有効成

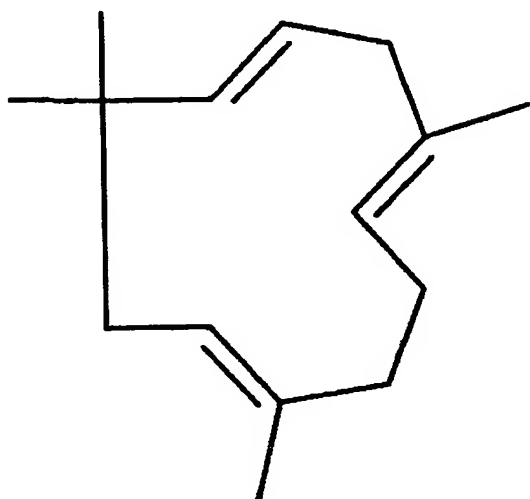
分として含有するIL-8産生促進剤は、ペパーミント抽出物、ドクダミ抽出物及び／又はカンゾウ抽出物を0.1～100重量%含有しているのが好ましく、1～100重量%含有しているのがより好ましい。

## 【0028】

次に、ペパーミントの成分化合物である、 $\alpha$ -フムレン、 $\alpha$ -ピネン、 $\beta$ -ピネンおよびリモネンからなる群より選ばれた少なくとも1種の化合物を有効成分として含有するIL-8産生促進剤について説明する。ペパーミントに含まれる成分化合物のCaco-2細胞に対するIL-8分泌量を調べた結果、下記式(1)で表される $\alpha$ -フムレン、下記式(2)で表される $\alpha$ -ピネン、下記式(3)で表される $\beta$ -ピネン及び下記式(4)で表されるリモネンにIL-8産生促進効果があることが判明した。

## 【0029】

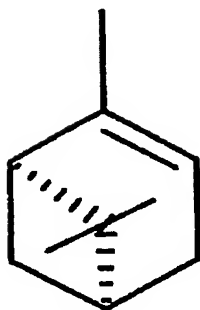
## 【化9】



(1)

## 【0030】

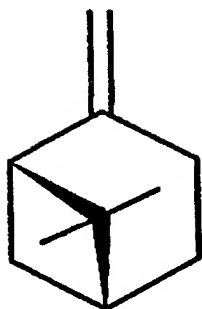
## 【化10】



(2)

【0031】

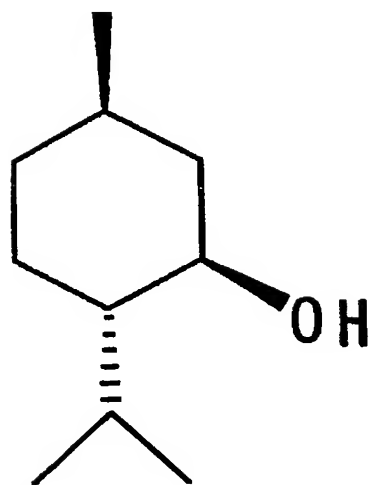
【化11】



(3)

【0032】

【化12】



(4)

前記式(1)～(4)で表される $\alpha$ -フムレン、 $\alpha$ -ピネン、 $\beta$ -ピネンおよびL-メントールを得る方法は特に限定されず、得られた化合物を単一化合物として、または2種以上の混合物として本発明のIL-8産生促進剤に使用することができる。これらの化合物をペパーミントから得る場合、抽出方法としては、上記と同様な方法で実施できる。抽出後、さらにろ過、溶媒による分配、濃縮、蒸留、水蒸気蒸留、クロマトグラフィー等の分離精製などによって得ることもできるが、その際に使用する抽出溶媒、精製用樹脂、器具、装置などは食品または食品添加物の製造に使用可能であるものが好ましい。 $\alpha$ -フムレン、 $\alpha$ -ピネン、 $\beta$ -ピネン、L-メントールを単離する際に用いる植物はほかにフトモモ科チョウジやホップなど、抽出する植物は特に限定されない。

【0033】

本発明に使用するペパーミント抽出物、ドクダミ抽出物、カンゾウ抽出物、 $\alpha$ -フムレン、 $\alpha$ -ピネン、 $\beta$ -ピネン、L-メントールのIL-8産生促進作用の評価法としては、特に限定されず、IL-8が産生される実験系に、上記抽出物を添加あるいは投与することによって評価できる。例えば、*in vitro*の場合、ヒト大腸癌由来細胞株であ

る HT-29 細胞や Caco-2 細胞などは培地中に IL-8 を分泌するが、そこに上記抽出物を添加して培養した後の培地中 IL-8 量を定量する実験系により評価でき、また、これらの細胞を TNF- $\alpha$  で刺激して IL-8 産生量を高めた状態で用いる同様の実験系により評価できる (Chowers, Y., et al., Gastroenterology, 120, 449~459, 2001; Lahav, M., et al., Clin. Exp. Immunol., 127, 226~233, 2002)。

#### 【0034】

本発明の IL-8 産生促進剤を含有することを特徴とする IL-8 に起因する免疫賦活剤、または感染症の予防及び/又は改善剤（以下、本発明予防改善剤と称する）は、飲食用及び医薬用として利用することができ、その形態は限定されず、例えば、保健機能食品（特定保健用食品、栄養機能食品）、健康食品、栄養補助食品などの飲食品、あるいは一般医薬品など容易に入手可能な医薬品又は医薬部外品などとして利用できる。

#### 【0035】

本発明の抽出物あるいは化合物にはペパーミント、ドクダミ、カンゾウの各抽出物以外の成分を含ませてもよい。本発明の抽出物あるいは化合物は、従来から食用に供されているペパーミント、ドクダミ、カンゾウの各抽出物あるいは抽出物に含まれる化合物を活性成分としているため、生体に対する安全性が高い。このため、本発明の IL-8 産生促進剤は、医薬品、機能性食品、飲食品、医薬部外品などの広範な製品中に含有させることができる。

#### 【0036】

本発明の IL-8 産生促進剤、IL-8 産生促進剤を含有することを特徴とする免疫賦活剤、または、本発明予防改善剤において、その配合量に関しては特に規定するものではないが、これらの製品における本発明の抽出物の濃度は、所望の効果を奏する範囲内で適宜選択することができる。人体に投与する場合の投与量としては、好ましくは 0.01~1000mg/kg 体重、より好ましくは 0.1~100mg/kg 体重を 1 回ないし数回に分けて投与する。

#### 【0037】

飲食品として用いる場合は、そのまま直接摂取することができ、また、公知の担体や助剤などの添加剤を使用して、カプセル剤、錠剤、顆粒剤など服用し易い形態に成型して摂取することができる。これらの成型剤における本発明予防改善剤の含有量は、好ましくは 0.1~100 重量%、より好ましくは 10~90 重量%である。さらに、対象となる食品の種類は、抽出物の IL-8 産生促進作用が阻害されないものであれば特に限定されない。

#### 【0038】

たとえば、飲食物材料に混合して、チューインガム、チョコレート、キャンディー、ゼリー、ビスケット、クラッカーなどの菓子類；アイスクリーム、氷菓などの冷菓類；茶、清涼飲料、栄養ドリンク、美容ドリンクなどの飲料；うどん、中華麺、スパゲティー、即席麺などの麺類；蒲鉾、竹輪、半片などの練り製品；ドレッシング、マヨネーズ、ソースなどの調味料；マーガリン、バター、~~マーガリン~~などの油脂類；パン、ハム、スープ、レトルト食品、冷凍食品など、すべての飲食物に使用することができる。

#### 【0039】

飲食用として本発明予防改善剤を摂取する場合、その摂取量は当該抽出物として成人一人一日当たり、好ましくは 0.01~1000mg/kg 体重、より好ましくは 0.1~100mg/kg 体重である。

#### 【0040】

医薬品として用いる場合は、その剤形は特に限定されず、投与目的や投与経路等に応じた、錠剤、カプセル剤、注射剤、点滴剤、散剤、座剤、顆粒剤、軟膏剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、クリーム剤等にすることができる。また、この組成物中には、一般に製剤に使用される結合剤、賦形剤、滑沢剤、崩壊剤、安定剤、乳化剤、緩衝剤等の添加物を含有させることができる。結合剤の好適な例としてはデンプン、トレハロース、デキストリン、アラビアゴム末などが挙げられる。賦形剤の好適な例としては、白糖、乳糖、ブドウ糖

、コーンスターチ、マンニトール、結晶セルロース、リン酸カルシウム、硫酸カルシウムなどが挙げられる。滑沢剤の好適な例としてはステアリン酸、タルク、ロウ、ポリエチレングリコールなどが挙げられる。崩壊剤の好適な例としてはデンプン、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチなどが挙げられる。安定剤の好適な例としては油脂、プロピレングリコールなどが挙げられる。乳化剤の好適な例としては、アニオン界面活性剤、非イオン性界面活性剤、ポリビニルアルコールなどが挙げられる。緩衝剤の好適な例としてはリン酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液が挙げられる。これら製剤の投与量としては、当該抽出物換算で成人一人一日当たり、好ましくは0.01~1000mg/kg体重、より好ましくは0.1~100mg/kg体重を1回ないし数回に分けて投与する。

#### 【0041】

医薬部外品として用いる場合は、必要に応じて他の添加剤などを添加して、例えば、軟膏、リニメント剤、エアゾール剤、クリーム、石鹸、洗顔料、全身洗剤、化粧水、ローション、入浴剤などに使用することができ、局所的に用いることができる。

#### 【実施例】

#### 【0042】

以下に実施例を記載して、本発明をさらに具体的に説明する。ただし、これらの実施例によって、本発明の範囲は限定的に解釈されるものではない。

#### 【0043】

##### (実施例1)

##### ペパーミント抽出物の調製

ガラス製容器にてペパーミント (*Mentha piperita* L.) 全草粉末 (株式会社カネカサンスパイス) 20gをエタノール100mlに浸し、室温及び遮光状態で、時折攪拌しながら1週間放置した。濾紙 (ADVANTEC No.2) を用いた濾過により粉末を除去し、得た抽出液を減圧濃縮して溶媒を除去し、ペパーミント抽出物1.30gを得た。

#### 【0044】

##### (実施例2)

##### ドクダミ抽出物の調製

ガラス製容器にてドクダミ (*Houttuynia cordata* Thunb.) 地上部粉末 (株式会社カネカサンスパイス) 20gをエタノール100mlに浸し、室温及び遮光状態で、時折攪拌しながら1週間放置した。濾紙 (ADVANTEC No.2) を用いた濾過により粉末を除去し、得た抽出液を減圧濃縮して溶媒を除去し、ドクダミ抽出物1.11gを得た。

#### 【0045】

##### (実施例3)

##### カンゾウ抽出物の調製

ガラス製容器にてカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.) 根茎部粉末 (株式会社カネカサンスパイス) 20gをエタノール100mlに浸し、室温及び遮光状態で、時折攪拌しながら1週間放置した。濾紙 (ADVANTEC No.2) を用いた濾過により粉末を除去し、得た抽出液を減圧濃縮して溶媒を除去し、カンゾウ抽出物1.88gを得た。

#### 【0046】

##### (実施例4)

##### IL-8産生促進作用(1)

小腸上皮細胞のモデルとしてCaco-2細胞 (ヒト結腸癌由来株化細胞: American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A.) を用い、そのIL-8産生に対するペパーミント、ドクダミ、カンゾウ抽出物の影響を評価した。

#### 【0047】

Caco-2細胞を24穴プレートに継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下で14日間培養して小腸上皮様に分化させた。培地は10%牛胎児血清、1%非必須アミノ酸溶液、2%グルタミン、100U/mlペリニシリン及び100μg/mlストレプトマイシンを含むDMEM培地 (SIGMA社) を用いた。実施例1で得たペパーミント抽出物、実施例2で得たドクダミ抽出物、実施例3で得たカンゾウ抽出物を終濃度100μg/mlとなる

ように培地中に添加し培養した。6時間培養した後、無添加培地に交換して12時間培養し、その培養上清をサンドイッチELISA法(Eckmann, L., et al., Gastroenterology, 105, 1689~1697, 1993)に供して、培養上清中IL-8量を定量した。コントロールに対するIL-8の相対濃度を図1に示す。

#### 【0048】

図1から明らかなように、ペパーミント、ドクダミ、カンゾウの各抽出物は、Caco-2細胞のIL-8産生を有意差： $P < 0.01$ を持って顕著に促進した。

#### 【0049】

##### (実施例5)

#### IL-8産生促進作用(2)

小腸上皮細胞のモデルとしてCaco-2細胞(ヒト結腸癌由来株化細胞: American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A.)を用い、そのIL-8産生に対する $\alpha$ -フムレン、 $\alpha$ -ピネン、 $\beta$ -ピネン、L-メントールの影響を評価した。

#### 【0050】

Caco-2細胞を24穴プレートに継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下で14日間培養して小腸上皮様に分化させた。培地は10%牛胎児血清、1%非必須アミノ酸溶液、2%グルタミン、100U/mlペリニシリン及び100 $\mu$ g/mlストレプトマイシンを含むDMEM培地(SIGMA社)を用いた。 $\alpha$ -フムレン(SIGMA社)、 $\alpha$ -ピネン(SIGMA社)、 $\beta$ -ピネン(SIGMA社)、L-メントール(SIGMA社)を終濃度100 $\mu$ g/mlとなるように培地中に添加し培養した。6時間培養した後、無添加培地に交換して12時間培養し、その培養上清をサンドイッチELISA法に供して、培養上清中IL-8量を定量した。コントロールに対するIL-8の相対濃度を図2に示す。

#### 【0051】

図2から明らかなように、 $\alpha$ -フムレン、 $\alpha$ -ピネン、 $\beta$ -ピネン、L-メントールは、Caco-2細胞のIL-8産生を顕著に促進した。有意差： $P < 0.01$ 。

#### 【0052】

##### (実施例6)

#### LDH(乳酸脱水素酵素)アッセイによる細胞毒性の評価(1)

Caco-2細胞に対するペパーミント、ドクダミ、カンゾウの各抽出物の細胞毒性を評価した。実施例4と同様に、小腸上皮様に分化させたCaco-2細胞を、ペパーミント、ドクダミ抽出物、カンゾウ抽出物を終濃度100 $\mu$ g/ml含んだ培地で24時間培養した。その後、培地を除去し、PBS(-)(ニッスイ)で細胞を2回洗浄し、さらにPBS(-)を700 $\mu$ l添加し、37℃で2時間静置した。その後、PBS(-)を回収し、細胞を0.1% Triton X-100(ナカライテスク)500 $\mu$ lに溶解した。LDH-細胞毒性テストワコー(和光純薬)を用いて、回収したPBS(-)及び細胞溶解液中のLDH濃度を測定した。回収したPBS(-)中のLDH濃度を遊離LDH量とし、細胞溶解液中のLDH濃度を細胞内LDH量として、下式により遊離LDH率(%)を算出した。

#### 【0053】

$$\text{遊離LDH率(\%)} = (\text{遊離LDH量}) / (\text{遊離LDH量} + \text{細胞内LDH量}) \times 100$$

図3から明らかなように、ペパーミント、ドクダミ、カンゾウの各抽出物は、コントロールと差がなく、細胞毒性はないことが示された。さらに、ペパーミント、ドクダミ、カンゾウの各抽出物によるIL-8産生促進作用は、細胞毒性によるものではないことが示された。

#### 【0054】

##### (実施例7)

#### LDH(乳酸脱水素酵素)アッセイによる細胞毒性の評価(2)

Caco-2細胞に対する $\alpha$ -フムレンの細胞毒性を評価した。実施例4と同様に、小腸上皮様に分化させたCaco-2細胞を、 $\alpha$ -フムレンを100 $\mu$ g/ml含んだ培地で24時間培養した。その後、培地を除去し、PBS(-)(ニッスイ)で細胞を2回洗浄

し、さらにPBS(-)を700 $\mu$ l添加し、37℃で2時間静置した。その後、PBS(-)を回収し、細胞を0.1% Triton X-100 (ナカライテスク) 500 $\mu$ lに溶解した。LDH-細胞毒性テストワコー (和光純薬) を用いて、回収したPBS(-)及び細胞溶解液中のLDH濃度を測定した。回収したPBS(-)中のLDH濃度を遊離LDH量とし、細胞溶解液中のLDH濃度を細胞内LDH量として、下式により遊離LDH率(%)を算出した。

【0055】

遊離LDH率(%) = (遊離LDH量) / (遊離LDH量 + 細胞内LDH量) × 100

図4から明らかなように、 $\alpha$ -フムレンは、コントロールと差がなく、細胞毒性はないことが示された。さらに、 $\alpha$ -フムレンによるIL-8産生促進作用は、細胞毒性によるものではないことが示された。

【0056】

(実施例8)

カプセル剤の調製

実施例1の方法により得られたペパーミント抽出物を40重量部、カルボキシメチルセルロース・ナトリウムを30重量部、結晶セルロースを20重量部、ビタミンCを10重量部の組成で混合、粉碎し、ゼラチン製カプセルに充填して、ペパーミント抽出物を含有する飲食用カプセル剤を調製した。

【0057】

(実施例9)

カプセル剤の調製

ペパーミント抽出物の代わりに実施例2記載のドクダミ抽出物を用いる以外は実施例8と同様にして、ドクダミ抽出物を含有する飲食用カプセル剤を調製した。

【0058】

(実施例10)

カプセル剤の調製

ペパーミント抽出物の代わりに実施例3記載のカンゾウ抽出物を用いる以外は実施例8と同様にして、カンゾウ抽出物を含有する飲食用カプセル剤を調製した。

【図面の簡単な説明】

【0059】

【図1】 抽出物によるCaco-2細胞培養上清中のIL-8濃度

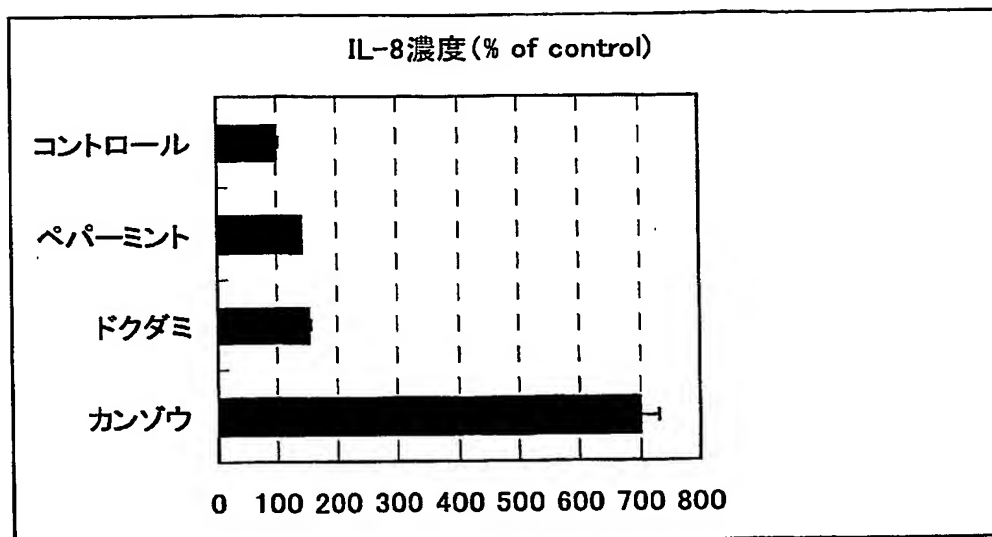
【図2】 成分によるCaco-2細胞培養上清中のIL-8濃度

【図3】 抽出物の細胞毒性

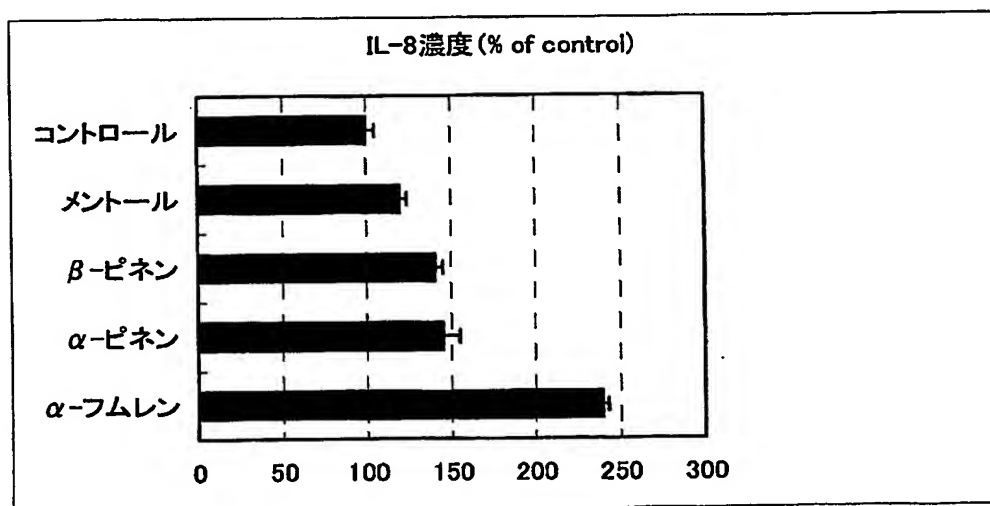
【図4】  $\alpha$ -フムレンの細胞毒性

【書類名】 図面

【図 1】

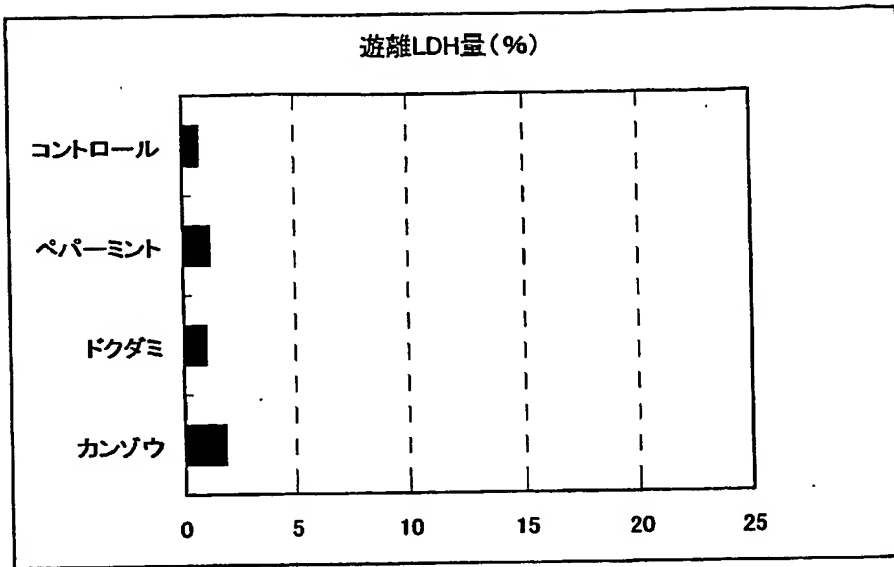


【図 2】

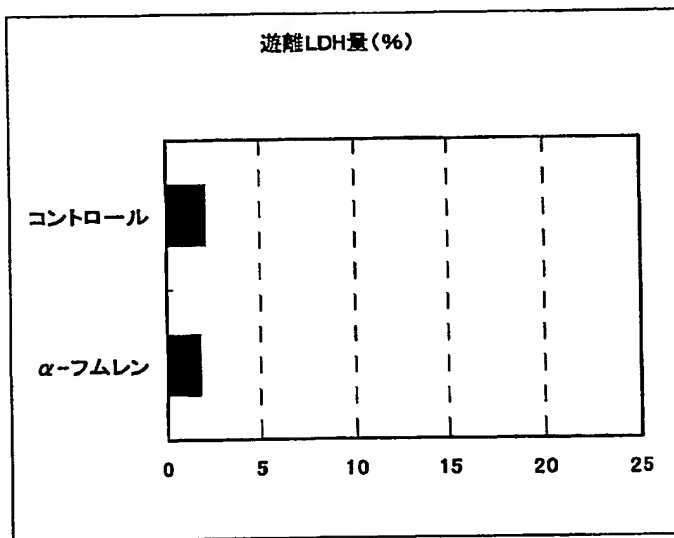




【図 3】



【図 4】



## 【書類名】要約書

## 【要約】

【課題】 安全な食品素材由来である IL-8 産生促進剤、及び、これを含有することを特徴とする免疫賦活剤、または感染症の予防及び／又は改善剤を提供することを課題とする。

【解決手段】 ペパーミント、ドクダミ、カンゾウからなる少なくとも 1 種の植物抽出物を有効成分として含有することを特徴とする組成物が IL-8 産生を促進すること、および  $\alpha$ -フムレン、 $\alpha$ -ピネン、 $\beta$ -ピネン、L-メントールからなる群より選ばれた少なくとも 1 種の化合物を有効成分として含有することを特徴とする組成物が IL-8 産生を促進することを見出した。それら IL-8 産生促進剤は、免疫賦活剤、または感染症の予防及び／又は改善剤を配合することを特徴とする飲食品に使用できる。

【選択図】 なし

特願 2003-394695

出願人履歴情報

識別番号 [000000941]

1. 変更年月日 1990年 8月27日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号  
氏 名 鐘淵化学工業株式会社
2. 変更年月日 2004年 9月 1日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号  
氏 名 株式会社カネカ

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**